

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 H797-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP00/05425	国際出願日 (日.月.年) 11.08.00	優先日 (日.月.年) 13.08.99	
出願人(氏名又は名称) サントリー株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N1/14, C12P7/64, A23D7/00, A23K1/16

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N1/14, C12P7/64, A23D7/00, A23K1/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP, 648076, A (Danochemo A/S), 19. 4月. 1995 (19. 04. 95), 特許請求の範囲&WO, 94/01001, A1&JP, 07-508417, A (ダノチェモ アクチェセルスカベト), 21. 9月. 1995 (21. 09. 95), 特許請求の範囲	15-17, 19-29
X	JP, 07-289143, A (花王株式会社), 7. 11月. 1995 (07. 11. 95), 特許請求の範囲	15-17, 19-29

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 09. 00

国際調査報告の発送日

19.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹

4B

9349

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

C (続き). 関連すると認めらるる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 06-153970, A (サントリー株式会社) 3. 6月. 1994 (03. 06. 94), 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-51
A	JP, 05-91889, A (昭和産業株式会社), 16. 4月. 1993 (16. 04. 93), 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-51

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05425

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N1/14, C12P7/64, A23D7/00, A23K1/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N1/14, C12P7/64, A23D7/00, A23K1/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP, 648076, A (Danochemo A/S), 19 April, 1995 (19.04.95), Claims & WO, 94/01001 & JP, 07-508417, A (Danochemo A/S), 21 September, 1995 (21.09.95), Claims	15-17, 19-29
X	JP, 07-289143, A (Kao Corporation), 07 November, 1995 (07.11.95), Claims	15-17, 19-29
A	JP, 06-153970, A (SUNTORY LIMITED), 03 June, 1994 (03.06.94), Claims (Family: none)	1-51
A	JP, 05-91889, A (SHOWA SANGYO CO., LTD.), 16 April, 1993 (16.04.93), Claims (Family: none)	1-51

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
05 September, 2000 (05.09.00)Date of mailing of the international search report  
19 September, 2000 (19.09.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 2 月 22 日 (22.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/12780 A1

(51) 国際特許分類: C12N 1/14,  
C12P 7/64, A23D 7/00, A23K 1/16

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05425

(22) 国際出願日: 2000 年 8 月 11 日 (11.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/229509 1999 年 8 月 13 日 (13.08.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サントリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒530-8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 秋元健吾

(AKIMOTO, Kengo) [JP/JP]; 〒618-0001 大阪府三島郡島本町山崎1-9-5-1006 Osaka (JP). 河島 洋 (KAWASHIMA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒569-1121 大阪府高槻市真上町6-11-1-113 Osaka (JP). 清水 昌 (SHIMIZU, Sakayu) [JP/JP]; 〒616-8212 京都府京都市右京区常盤山下町6-9 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.); 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37 森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MICROORGANISM SECRETING OUT LIPID AND PROCESS FOR PRODUCING THE LIPID AND LIPID BALLS HAVING THE LIPID ENCAPSULATING THEREIN BY USING THE MICROORGANISM

(54) 発明の名称: 脂質を菌体外に分泌する微生物ならびに当該微生物を用いた脂質および脂質を内包する油滴小胞の製造方法

(57) Abstract: A microorganism characterized by producing a lipid constituted by unsaturated fatty acids and secreting outside the cells the thus produced lipid in the form of lipid balls having the lipid encapsulated therein; a method for screening this microorganism; a process for efficiently producing the lipid containing the unsaturated fatty acids by using this microorganism; lipid balls having the lipid containing the unsaturated fatty acids encapsulated therein; and foods, cosmetics and animal feeds containing these lipid balls. Artificially treated microorganisms or microorganisms collected from nature are grown in a solid medium and a strain forming lipid balls around its colonies is selected, and/or grown in a transparent liquid medium and a strain causing cloudiness in the culture medium is selected. The thus obtained microorganism is cultured and the lipid balls having the secreted lipid are separated from the culture medium followed by the separation and purification of the lipid.

[続葉有]

WO 01/12780 A1



---

(57) 要約:

不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質を産生し、かつ産生した脂質を油滴小胞に内包して菌体外に分泌する特徴を有する微生物、及び当該微生物をスクリーニングする方法、ならびに当該微生物を用いて不飽和脂肪酸を含有する脂質を効率よく製造する方法を提供する。さらに不飽和脂肪酸を有する脂質を内包する油滴小胞およびこれを添加してなる食品、化粧品、動物飼料を提供する。

人為的処理を施した微生物又は自然界から採取した微生物を固体培地で生育させ、コロニーの周りに油滴小胞 (lipid ball) を形成する菌株および／または透明な液体培地を用いた培養で培養液に濁りが生じる菌株を選抜する。得られた微生物を培養し、培養液中に分泌された脂質を有する油滴小胞を培養液から分離し、脂質を分離・精製する。

## 明 細 書

脂質を菌体外に分泌する微生物ならびに当該微生物を用いた脂質および脂質を内包する油滴小胞の製造方法

### 発明の分野

本発明は、不飽和脂肪酸を有する脂質を小胞に内包して菌体外に分泌する特徴を有する微生物、または、炭素数が18で二重結合数が3以上又は炭素数が20以上で二重結合数が2以上である不飽和脂肪酸を有する脂質を菌体外に分泌する特徴を有する微生物、より具体的には不飽和脂肪酸を有する脂質を産生し菌体内に蓄積する能力を有する微生物に人為的処理を施して得られる、不飽和脂肪酸を有する脂質を小胞に内包して菌体外に分泌する特徴を有する微生物あるいは炭素数が18で二重結合数が3以上又は炭素数が20以上で二重結合数が2以上である不飽和脂肪酸を有する脂質を産生し菌体内に蓄積する能力を有する微生物に人為的処理を施して得られる、炭素数が18で二重結合数が3以上又は炭素数が20以上で二重結合数が2以上である不飽和脂肪酸を有する脂質を菌体外に分泌する特徴を有する微生物、および当該微生物を利用して効率的に不飽和脂肪酸を含有する脂質を製造する方法、ならびに当該微生物のスクリーニング方法、さらに不飽和脂肪酸を有する脂質を内包する油滴小胞およびこれを添加してなる食品、化粧品、動物飼料に関する。

### 背景技術

近年、高度不飽和脂肪酸の持つさまざまな生理活性が注目を集めるようになってきている。例えば、アラキドン酸は、子宮収縮・弛

緩作用、血管拡張作用、血圧降下作用等の生理活性を有するプロスタグランジン、トロンボキサン、プロスタサイクリン、ロイコトリエン等の前駆体物質といわれているが、近年、特に乳幼児の発育に必要な成分として、ドコサヘキサエン酸とともに急速に研究が進められている。そして、アラキドン酸やドコサヘキサエン酸の他、 $\gamma$ -リノレン酸、ジホモ $\gamma$ -リノレン酸、エイコサペンタエン酸などの高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を添加した各種の食品、化粧品及び動物飼料が注目を集め、一部これらの高度不飽和脂肪酸を添加した商品が上市されている。

これに伴って、これら高度不飽和脂肪酸を効率的に生産する方法についても精力的に研究されるようになってきている。

例えば、アラキドン酸、ジホモ $\gamma$ -リノレン酸、エイコサペンタエン酸などの高度不飽和脂肪酸を産生する微生物として知られているモルティエセラ属、特にモルティエセラ亜属に属する微生物を用いて発酵法によりアラキドン酸、ジホモ $\gamma$ -リノレン酸、 $\gamma$ -リノレン酸又はエイコサペンタエン酸を効率よく製造する方法が開発されている（特開昭63-44891、特開昭63-12290、特開昭63-14696、特開平5-91887、特開昭63-14697）。さらにモルティエセラ属モルティエセラ亜属に属する微生物に変異処理を施して得られる、 $\Delta 12$ 不飽和化活性が低下又は欠失している変異株を用いてミード酸を製造する方法も知られている（特開平5-91888）。

このように、高度不飽和脂肪酸を有する脂質を産生する微生物を用いた該脂質の製造が、高度不飽和脂肪酸の供給源として主流になりつつある。これらの微生物は、産生する高度不飽和脂肪酸を細胞膜の構成成分とするだけではなく、高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする油脂（トリグリセリド）として菌体内に蓄積するという特徴

を持っている。そして、この菌体内に蓄積した油脂を利用することによって、高度不飽和脂肪酸の高い生産性が確保できるようになってきた。

この従来の製造方法の場合、1回の培養で得られる油脂の量は、培養で得られる微生物の菌体量と菌体当たりの油脂の産生量の積となり、より多くの油脂を生産するには、菌体量をいかに増やしかつ菌体当たりの油脂産生量をいかに増加させるかが課題であった。そしてこれまでの研究により、培養条件によってこの両方がある程度は増加させることができることが明らかになっているが、菌体量は培養装置の容積など物理的な要因によって、また、菌体当たりの油脂の量は用いる微生物の生理的な要因によって、各々一定の限界がある。

一方、微生物が産生し菌体内に蓄積した脂質を利用しようとする場合、微生物を培養した後に菌体を集め、これらをミル等によって処理し菌の細胞膜を破壊してから菌体内に蓄積した脂質を抽出することが必要である。

微生物が産生した物質を菌体内に蓄積させるのではなく、それを菌体外に分泌させることができれば、産生された物質が微生物に生理的な負荷を与えることは軽減され、微生物は産生物を作り続けることができる。また、微生物の産生物を単離、抽出する場合も、培養液からの抽出で済むため、処理が容易になるだけでなく、微生物を生かしたままで連続的に処理できるという利点がある。

こうしたことから、近年、菌体内に蓄積する油脂を菌体外に分泌する試みが福井作蔵らによりなされている（BIO INDUSTRY 12, 36-46（1995））。福井作蔵らは化石燃料に代わる新規バイオ燃料を開発するために、微生物による油脂の分泌生産の研究を行い、Trichosporon属酵母の育種により糖並びにn-アルカンを油脂に変換し菌体

外に分泌することに成功している。そして、菌体外へ分泌したトリグリセリド (TG) の構成脂肪酸分子種はオレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、ステアリン酸であることを明らかにしている。ただしこの場合、TGは直接、菌体外に分泌されるため、分泌されたTGが再び菌体内に取り込まれ、代謝されてしまう、という欠点がある。

しかし、炭素数が18で二重結合数が3以上又は炭素数が20以上で二重結合数が2以上の不飽和脂肪酸を有する脂質を産生する能力を有する微生物において、産生した脂質を菌体外に分泌する微生物あるいは不飽和脂肪酸を有する脂質を産生する能力を有する微生物において、産生した脂質を菌体外に分泌する際に、直接分泌するのではなく小胞に内包して分泌する微生物は全く知られていなかった。

また「微生物産生脂肪酸とその利用」鈴木修、フレグランスジャーナル1989(6) P67-75には、カビによるγ-リノレン酸生産の研究で、Mucor 属の培養培地に界面活性剤を加えて一部脂質を菌体外に漏出させることが報告されている。しかし、これは人為的に菌体の細胞膜を壊す処理を行って、菌体内に蓄積した脂質を漏出させる方法に関するものであって、菌自体による菌体内で生産した脂質を菌体外に分泌する能力を利用しようというものではない。

したがって、炭素数が18で二重結合数が3以上又は炭素数が20以上で二重結合数が2以上の不飽和脂肪酸を有する脂質を産生する能力を有する微生物において、産生した脂質を菌体外に分泌する特徴を有する微生物、あるいは不飽和脂肪酸を有する脂質を産生する能力を有する微生物において、産生した脂質を小胞に内包して菌体外に分泌する特徴を有する微生物を見出し、当該微生物を用いて不飽和脂肪酸を含有する脂質を効率よく製造する方法の開発が望まれている。



ところで、新たな能力を有する微生物を見出すためには、そうした能力を有する微生物の効率的なスクリーニングの方法の開発が欠かせない。上記の糖並びにn-アルカンを油脂に変換し菌体外に分泌する Trichosporon 属酵母の育種の場合には、次のようなスクリーニング方法が採られている。即ち、寒天平板培地（YPD 培地など）に出現した酵母コロニーを、紫外線処理（15ワット、距離30 cm、時間15分）（この処理は、次の重層処理におけるコロニー細胞の分散を抑止するためのもので、変異誘導のための処理ではない）し、紫外線処理済みコロニー平板に、検定菌株数  $10^5$  個を含むYPD 軟寒天培地を重層し、28℃で2日間培養する。検定菌株にはそれぞれ飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の栄養要求性を有するA-1株とole-1株を用い、コロニーの周りに大きいハロー（検定菌のマイクロコロニー環）を与えるコロニーを脂質分泌株として選抜する。脂質分泌株の選抜には、軟寒天培地にリパーゼを含ませたもの、含ませてないものの2つを用いる。

この方法は、重層処理が可能な酵母には適用できるが、重層処理が不可能な微生物のスクリーニングには用いることができないという大きな欠点がある。また、検定方法が煩雑になるという欠点もある。

従って、炭素数が18で二重結合数が3以上又は炭素数が20以上で二重結合数が2以上の不飽和脂肪酸を有する脂質を産生する能力を有する微生物において、産生した脂質を菌体外に分泌する特徴を有する微生物を見出すためには、当該微生物を簡便な方法で効率的にスクリーニングでき、かつ種々の微生物に適用可能なスクリーニング方法の開発が、また産生した脂質を菌体外に分泌する際に、小胞に内包して分泌するような微生物を見出すための新しいスクリーニング法の開発が望まれている。

## 発明の開示

従って本発明は、炭素数が18で二重結合数が3以上又は炭素数が20以上で二重結合数が2以上である不飽和脂肪酸を有する脂質を産生する能力を有する微生物において、産生した脂質を菌体外に分泌する特徴を有する微生物又は不飽和脂肪酸を産生する能力を有する微生物で、産生した脂質を小胞に内包して菌体外に分泌する特徴を有する微生物、および当該微生物を利用して効率的に当該脂質を製造する方法、ならびに当該微生物のスクリーニング方法を提供しようとするものである。本発明はまた、不飽和脂肪酸を有する脂質を内包する油滴小胞およびこれを添加してなる食品、化粧品、動物飼料を提供しようとするものである。

本発明者は、上記の目的を達成するために鋭意研究した結果、不飽和脂肪酸を有する脂質を産生し菌体内に蓄積する能力を有する微生物に人為的処理を施すことにより、産生した該脂質を小胞に内包して菌体外に分泌する能力を有する微生物を作出することができることを見出した。

また、人為的処理を施した微生物群や自然界から採取した微生物群から、目的とする能力を有する微生物を得るために、当業者であれば容易に実施できる次のような簡便なスクリーニング方法を見出した。即ち、一次スクリーニングとして、人為的処理が施された株又は自然界から採取した株を固体培地上で生育させた場合にコロニーの周りに油滴小胞 (lipid ball) が存在する菌株を選抜する。続いて二次スクリーニングとして、一次スクリーニングで選抜した株を透明な液体培地 (4%グルコース、1%酵母エキス pH6.0) 中で28℃で2日間振盪培養する。菌体内に脂質を蓄積する微生物であれば、培養中に培地が白濁することはないが、産生した脂質を菌体外に分

泌していれば培地が白濁するため、脂質を菌体外に分泌する能力を有する微生物は、培養液の白濁の程度を目視で確認するだけで容易にスクリーニングすることができる。

そして、得られた微生物を利用して、当該脂質を内包する油滴小胞を効率的に菌体外に分泌させるためには、グルコース濃度を高めた培地及び／又はpHを高めた培地で培養すればよいことを見出した。

さらに、菌体外に分泌された油滴小胞が、遠心分離によって簡単に培養液から分離できること、また油滴小胞の中の脂質を単離するには、通常の有機溶媒を用いた抽出方法の他、遠心分離やクロマトグラフィー法が使えることを見出した。

さらにまた、培養液から分離した脂質を内包する油滴小胞は水又は親水性物質に分散しやすく、脂質を酸化に対して安定に保持するという特徴を持っているため、この油滴小胞を、そのまま食品や化粧品または動物飼料に添加すれば、これまでに無い特徴を持った不飽和脂肪酸を含有する食品や化粧品または動物飼料が得られることを見出し、本発明を完成した。

#### 発明の実施の形態

本発明において、炭素数が18で二重結合数が3以上又は炭素数が20以上で二重結合数が2以上である不飽和脂肪酸とは、例えば、5, 8, 11, 14-エイコサテトラエン酸（アラキドン酸）、8, 11, 14-エイコサトリエン酸（ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸）、6, 9, 12-オクタデカトリエン酸（ $\gamma$ -リノレン酸）、5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸、8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸、6, 9, 12, 15-オクタデカテトラエン酸（ステアリドン酸）、9, 12, 15-オクタデカトリエン酸（ $\alpha$ -リノレン酸）、4, 7, 10, 13, 16,

19-ドコサヘキサエン酸（DHA）、8, 11-エイコサジエン酸、5, 8, 11-エイコサトリエン酸（ミード酸）、7, 10, 13, 16-ドコサテトラエン酸、4, 7, 10, 13, 16-ドコサペンタエン酸、7, 10, 13, 16, 19-ドコサペンタエン酸等を挙げることができる。

本発明は、炭素数が18で二重結合数が3以上又は炭素数が20以上で二重結合数が2以上である不飽和脂肪酸を有する脂質を菌体外に分泌する特徴を有する微生物、又は不飽和脂肪酸を有する脂質を小胞に内包して菌体外に分泌する特徴を有する微生物を与える。さらに具体的には、炭素数が18で二重結合数が3以上又は炭素数が20以上で二重結合数が2以上である不飽和脂肪酸を有する脂質を産生し菌体内に蓄積する能力を有する微生物、又は不飽和脂肪酸を有する脂質を産生し菌体内に蓄積する能力を有する微生物に、人為的処理を施すことによって得られる、菌体内で産生した脂質を直接又は小胞に内包して菌体外に分泌することのできる微生物を与える。

ここで菌体内に不飽和脂肪酸を有する脂質を産生し菌体内に蓄積する能力を有する微生物とは、具体的には従来から知られているγ-リノレン酸生産能を有する微生物やアラキドン酸生産能を有する微生物、DHA生産能を有する微生物、オメガ9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物等が挙げられ、アラキドン酸生産能を有する微生物としては、モルティエレラ（Mortierella）属、コニディオボラス（Conidiobolus）属、フィチウム（Pythium）属、フィトフトラ（Phytophthora）属、ペニシリウム（Penicillium）属、クロドスポリウム（Cladosporium）属、ムコール（Mucor）属、フザリウム（Fusarium）属、アスペルギルス（Aspergillus）属、ロードトルラ（Rhodotorula）属、エントモフトラ（Entomophthora）属、エキノスポランジウム（Echinosporangium）属、サブロ

レグニア (Saprolegnia) 属に属する微生物を挙げることができる。モルティエレラ (Mortierella) 属モルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する微生物では、例えばモルティエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata)、モルティエレラ・エキシグア (Mortierella exigua)、モルティエレラ・フィグロフィラ (Mortierella hygrophila)、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina)、モルティエレラ・シュマツカリ (Mortierella schmuckeri)、モルティエレラ・ミヌティシマ (Mortierella minutissima) 等を挙げることができる。具体的にはモルティエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata) IF08570、モルティエレラ・エキシグア (Mortierella exigua) IF08571、モルティエレラ・フィグロフィラ (Mortierella hygrophila) IF05941、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) IF08568、ATCC16266、ATCC32221、ATCC42430、CBS219.35、CBS224.37、CBS250.53、CBS343.66、CBS527.72、CBS529.72、CBS608.70、CBS754.68 等の菌株を挙げることができる。

これらの菌株はいずれも、大阪市の財団法人醗酵研究所 (IFO)、及び米国のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection, ATCC) 及び、Centrralbureau voor Schimmelcultures (CBS) からなんら制限なく入手することができる。また本発明者が土壌から分離した菌株モルティエレラ・エロンガタ SAM0219 (微工研菌寄第8703号) (微工研条寄第1239号) を使用することもできる。これらのタイプカルチャーに属する菌株、あるいは自然界から分離した菌株をそのまま用いることができるが、増殖及び／又は単離を1回以上行うことによって得られる元の菌株とは性質の異なる自然突然変異株を用いることもできる。

また本発明において、上記不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を

用いて、例えば以下に記載する変異処理や遺伝子操作等によって得られる、 $\Delta 5$  不飽和化反応や $\Delta 6$  不飽和化反応、 $\Delta 9$  不飽和化反応、 $\Delta 12$  不飽和化反応、 $\omega 3$  系不飽和化反応、あるいは鎖長延長化反応等の少なくとも一つが増強、あるいは低下又は欠失した微生物を使用することができる。

上記微生物に施される人為的処理としては、変異処理や遺伝子操作、細胞融合等が挙げられる。変異処理としては、放射線（X線、ガンマー線、中性子線）照射や紫外線照射、高熱処理等を行ったり、また微生物を適当なバッファー中などに懸濁し、変異原を加えて一定時間インキュベート後、適当に希釈して寒天培地に植菌し、変異株のコロニーを得るといった一般的な突然変異操作を行うこともできる。

変異原としては、ナイトロジェンマスタード、メチルメタンサルホネート（MMS）やN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）等のアルキル化剤、5-ブロモウラシル等の塩基類似体、マイトマイシンC等の抗生物質、6-メルカプトプリン等の塩基合成阻害剤、プロフラビン等の色素類、4-ニトロキノリン-N-オキシド等のある種の発がん剤、塩化マンガン、ホルムアルデヒド等の化合物を挙げることができる。また、使用する微生物は、生育菌体（菌糸）でも良いし、孢子でも良い。

遺伝子操作による場合には、通常の遺伝子組換え操作による手法が用いられる。

上記のように人為的処理を施した微生物群又は常法に従って自然界から採取した微生物群は、以下の方法により目的とする株を分離することができる。一次スクリーニングとして人為的処理が施された株又は自然界から採取した株を、固体培地上に塗布し、コロニーのまわりに油滴小胞（Lipid ball）が存在することを目安に菌株を

選択し、二次スクリーニングとして、一次スクリーニングで選択した菌株が菌体外に脂質を分泌するかどうかを液体培養で評価する。評価方法は、例えば、透明な液体培地（4%グルコース、1%酵母エキスを pH6.0）4 mlを試験管に入れ、120℃で20分間殺菌した後、一次スクリーニングで選択した菌株を一白金耳植菌し、28℃で2日間振盪培養する。

モルティエラ属モルティエラ亜属に属する微生物など菌体内に不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドを蓄積しても菌体外にそれを分泌しない微生物は、前記液体培地で培養しても培地が濁ることはないが、産生した脂質を菌体外に分泌していれば培地が白濁することから、菌体外に脂質を分泌している菌は容易に確認することができる。しばらく、静置しても白濁した状態が変わらなければ脂質は油滴小胞として分泌されているが、脂質が直接、分泌されている場合にはしばらく静置すると脂質の層が培地上面に浮上するため両者を容易に判別できる。二次スクリーニングに使用する培地の成分は透明な液体培地とすることができるものであれば適宜選択することができ、培地組成も評価する微生物の生育に適した組成を適宜選択すれば良い。

なおこのようにして得られた株の中から、生育能や脂質生産能が親株と同様又はそれ以上の株を選択することが好ましい。また選抜にかける微生物又は目的によっては上記一次スクリーニングあるいは上記二次スクリーニングのどちらかだけでも、目的とする株を選抜することが可能であるが、両者を組み合わせることによって、より確実に選抜することができる。また上記2つのスクリーニング法を組み合わせで行う場合、上記一次スクリーニングが先であっても上記二次スクリーニングが先であってもよい。

上記の方法によって得られた株として、例えばアラキドン酸生産

能を有するモルティエラ・アルピナ IF08568 から本発明者らが誘導した、菌体内で産生した脂質を小胞に内包して菌体外に分泌するモルティエラ・アルピナ SAM 2241 (FERM BP-7272) 又は SAM 2242 を使用することができるが、この菌株に限定しているわけではなく、上記スクリーニング方法から本発明の菌体内で生産された脂質を菌体外に分泌する菌株は容易に得られ、それらをすべて使用することができる。

なお上記のスクリーニングによって得られる本発明の微生物はスフェロプラスト化又はプロトプラスト化が可能な微生物であり、本発明の微生物を用いて、細胞壁を完全に取り除いたプロトプラストや細胞壁の一部が残っているスフェロプラストを簡単に得ることができる。これは例えば変異処理に用いた親株には見られない性質であり、変異処理によって細胞壁の構造が変化して脆くなったためと考えられる。

上記のようにして得られた例えば菌体内で生産された脂質を小胞に内包して菌体外に分泌する菌株を用いて以下の方法により、油滴小胞又は脂質を得ることができる。まず上記本発明の微生物の培養において、本発明の微生物を培養する為には、その菌株の孢子、菌糸、又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地に接種し培養する。

液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているものが、いずれも使用できるが、これらに限られるものではない。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンスティープリカー、大豆タンパク、脱脂大豆、綿実カス等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウ



ム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができる。

この他に必要に応じリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。これらの培地成分は微生物の生育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上一般に、炭素源は0.1～40重量%、好ましくは1～25重量%の濃度とするのが良い。さらに、炭素源を逐次添加すること及び／又は初発炭素源濃度を高くすることで菌体外への脂質分泌を促進することができる。又、初発の窒素源添加量は0.1～10重量%、好ましくは0.1～6重量%とし、培養途中に窒素源を流加しても構わない。

培養温度は使用する微生物により異なるが、5～40℃、好ましくは20～30℃とし、また20～30℃にて培養して菌体を増殖せしめた後5～20℃にて培養を続けて不飽和脂肪酸を生産せしめることもできる。このような温度管理により、生成脂肪酸中の高度不飽和脂肪酸の生成量を上昇せしめることができる。培地のpHは4～10、好ましくは5～9として通気攪拌培養、振盪培養、バイオリアクタによる連続培養又は静置培養を行う。なお、初発pHを5～9好ましくは6～9、より好ましくは7～9にすることで菌体外への脂質分泌を促進することができる。培養は通常2～30日間、好ましくは5～20日間、より好ましくは5～15日間行う。

本発明においては、培地中に目的とする不飽和脂肪酸の前駆体を添加して培養することにより、目的とする不飽和脂肪酸、例えば5, 8, 11, 14-エイコサテトラエン酸（アラキドン酸）、8, 11, 14-エイコサトリエン酸（ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸）、6, 9, 12-オクタデカトリエン酸（ $\gamma$ -リノレン酸）、5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸、8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸、6, 9, 12

、15- オクタデカテトラエン酸（ステアリドン酸）、9, 12, 15-オクタデカトリエン酸（ $\alpha$ - リノレン酸）、4, 7, 10, 13, 16, 19- ドコサヘキサエン酸（DHA）、8, 11-エイコサジエン酸、5, 8, 11-エイコサトリエン酸（ミード酸）の産生を促進することもできる。

前駆体としては例えば、テトラデカン、ヘキサデカン、オクタデカン等の炭化水素、テトラデカン酸、ヘキサデカン酸、オクタデカン酸等の脂肪酸又はその塩（例えばナトリウム塩、カリウム塩等）及びエステル、又は脂肪酸が構成成分として含まれる油脂（例えば、オリーブ油、ヤシ油、パーム油、亜麻仁油、魚油、微生物油脂）等を挙げることができるが、これらに限られるものではない。

また不飽和脂肪酸や該不飽和脂肪酸が構成成分として含まれる油脂（例えば魚油、微生物油脂）を、培地中に添加して培養することにより、本発明の微生物が、培地に添加した不飽和脂肪酸又は油脂を菌体内に取り込み、該不飽和脂肪酸を有する脂質を内包する油滴小胞として菌体外に分泌するため、使用する微生物が本来生産しない不飽和脂肪酸であっても、このような不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質を内包する油滴小胞を製造することが可能である。

上記前駆体を含むこれらの基質の総添加量は培地に対して0. 001～10重量%、好ましくは0. 5～10重量%である。これらの基質は生産微生物を接種する前又はその直後に加えてもよく、又は培養を開始した後に加えてもよく、あるいは両時点で加えてもよい。培養開始後の添加は1回でもよく、又は複数回に分けて間欠的に添加してもよい。あるいは、連続的に添加することもできる。又、これらの基質を唯一の炭素源として培養してもよい。

上記のように本発明の微生物を培養することによって、不飽和脂肪酸を有する脂質が大量に菌体内で生産され、該脂質は直接又は小

胞に内包されて油滴小胞として菌体外に分泌される。液体培地を使用した場合には、培養物から培養菌体を取り除いた培養液から、例えば、次のようにして油滴小胞又は脂質の採取を行う。

培養終了後、培養物から遠心分離及び濾過等の常用の固液分離手段により培養菌体を取り除き、脂質を内包する油滴小胞が分散している培地（培養液と言う）を得る。この培養液から、脂質を内包する油滴小胞は、凍結乾燥により培地成分をも含むものとして単離することもできるし、常法の遠心分離やカラム処理により培地成分を含まず油滴小胞のみを単離することもできる。例えば遠心分離機（TOMYRL-101）やスイングローター（TS-7）を使用し、最大遠心加速度  $1000 \times g$  以上、好ましくは  $1500 \times g$  以上で約 10 分間、遠心することによって油滴小胞を分離することができる。

上記方法によって得られる油滴小胞は、糖質、蛋白質、脂質から構成されている。そして水分を除いた組成で表すと、糖質は 0～70%、好ましくは 20～60%、蛋白質は 0～40%、好ましくは 10～30%、脂質は 20～100%、好ましくは 30～80% からなる。しかしながら、これら糖質、蛋白質、脂質の割合は、培養条件により種々とりうることができ、この比率に限定されるわけではない。また、実際には水分も含まれる場合があることは当然である。

本発明の油滴小胞は、直径が平均  $0.2 \sim 10 \mu m$ 、好ましくは  $2 \sim 4 \mu m$  で、最も大きい小胞の直径が  $40 \mu m$ 、好ましくは  $10 \mu m$  である。また遠心分離にて分離することが可能で、例えば遠心分離機（TOMYRL-101）やスイングローター（TS-7）を使用し、最大遠心加速度  $1000 \times g$  以上、好ましくは  $1500 \times g$  以上で約 10 分間、遠心することによって油滴小胞を分離することができる。さらに本発明の油滴小胞は、水又は親水性物質に分散しやすく、脂

質を酸化に対して安定に保持するという性質を有する。

また油滴小胞中の脂質を採取するには、油滴小胞を分離する前の培養液から直接、又は培養液から分離した油滴小胞のいずれからでも行なえる。例えば培養液から分離した油滴小胞から抽出する場合、抽出方法としては従来行われている菌体から脂質を抽出する方法と同様にして実施することができる。すなわち油滴小胞を、窒素気流下で有機溶媒によって抽出処理する。有機溶媒としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル等を用いることができ、又メタノールと石油エーテルの交互抽出やクロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いた抽出によっても良好な結果を得ることができる。また、油滴小胞を分離する前の培養液から直接抽出する場合にも、同様の有機溶剤を用いることが出来るが、現実的には水と分離する溶剤を使うのが望ましく、また、食品用途を考えた場合にはヘキサンの使用が望ましい。抽出物から減圧下で有機溶媒を留去することにより、不飽和脂肪酸を含有する脂質が得られる。

上記のようにして得られた脂質中には、不飽和脂肪酸が、トリグリセリドやフォスファチジルコリン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジリンノシトールなどに結合した状態で存在している。そして脂質は、グリセリド（トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド）、リン脂質、脂肪酸、糖脂質、ステロールエステルなどから構成され、脂質中のグリセリドは50～100%、好ましくは70～100%、リン脂質は0～50%、好ましくは0～30%、脂肪酸と糖脂質とステロールエステルは合わせて0～30%、好ましくは0～15%からなる。また脂質中のトリグリセリドは50～100%、好ましくは70～100%である。

例えばモルティエラ亜属に属する微生物から誘導された本発明

の微生物を用いて製造される不飽和脂肪酸を含有する脂質の油脂組成としては、中性脂質が70～100重量%、極性脂質が0～30重量%であり、中性脂質の主な成分であるトリグリセリドは脂質中70～99重量%である。不飽和脂肪酸の含量は用いる微生物や培養条件によって異なるが、例えば脂質中の、アラキドン酸含量は、全脂肪酸に対して10重量%以上、好ましくは20～100重量%、より好ましくは40～100重量%である。またアラキドン酸のトリグリセリド中の全脂肪酸に対しする割合は、10重量%以上、好ましくは15～100重量%、より好ましくは35～90重量%である。しかしながら、本発明はモルティエラ亜属の属する微生物が分泌する油滴小胞に限定しているわけではなく、産生される脂肪酸もアラキドン酸に限定しているわけではない。さらに、培地に添加した油脂を菌体に採り込ませた後、油滴小胞の油脂として分泌させることも可能であり、油滴小胞の油脂組成、目的とする脂肪酸の割合は千差万別であり、ある意味では自由に設計することができる。

油滴小胞又は培養液から採取した不飽和脂肪酸を有する脂質から、不飽和脂肪酸を含有するトリグリセリドを分離精製するには、常法に従って、例えば、脱酸法、脱ガム法、脱水法、水蒸気蒸留法、分子蒸留法、冷却分離法、カラムクロマトグラフィー法などにより行う。

不飽和脂肪酸を含有する脂質から、不飽和脂肪酸を分離するには、混合脂肪酸あるいは混合脂肪酸エステル状態で、常法により、例えば、尿素付加法、冷却分離法、カラムクロマトグラフィー法などにより濃縮分離することにより行う。

本発明の油滴小胞は不飽和脂肪酸をトリグリセリドの形で豊富に含有しており、その用途に関しては特に制限はないが、例えば、食

品、飲料、化粧品、医薬品動物飼料などの原料並びに添加物として使用することができる。そして、その使用目的、使用量に関して何ら制限を受けるものではない。

例えば、食品としては、一般食品の他、機能性食品、栄養補助食品、未熟児用調製乳、乳児用調製乳、乳児用食品、妊産婦食品又は老人用食品等を挙げることができる。本発明の油滴小胞は、水や親水性物質に対する分散性に優れているため、従来添加することが困難であった油脂を含まない食品、特に各種飲料に添加することが可能となる。また本発明の油滴小胞は、脂質を空気酸化に対して安定的に保持することができるため、従来の油脂を含む食品への添加も、より容易に行なえるようになる。油脂を含む食品例として、肉、魚、またはナッツ等の本来油脂を含む天然食品、スープ等の調理時に油脂を加える食品、ドーナッツ等の熱媒体として油脂を用いる食品、バター等の油脂食品、クッキー等の加工時に油脂を加える加工食品、あるいはハードビスケット等の加工仕上げ時に油脂を噴霧または塗布する食品等が挙げられる。さらに、機能性食品・医薬品の形態であっても構わなく、例えば、経腸栄養剤、粉末、顆粒、トローチ、内服液、懸濁液、乳濁液、シロップ、ドリンク剤等の加工形態であってもよい。

## 実施例

次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。しかし、本発明は、実施例に限定されるものではない。

### 実施例 1. *Mortierella alpina* IF08568 の変異処理による油滴小胞を菌体外に分泌する菌株の取得

モルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) IF08568 を Czapek寒天培地 (0.2%  $\text{NaNO}_3$ 、0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、

0.05% KCl、0.01%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3%シュークロース、2%寒天、pH 6.0) 300 mlを含む大型スラント瓶に植菌し、2週間、28℃で培養した。

培養後、大型スラント瓶にTween80を2滴加えた滅菌水50 mlを加えてよく振り、4重のガーゼで濾過した。この操作を2回繰り返して、濾液を8000 x gで10分間遠心した。このようにして得られた胞子を50mM Tris/maleate 緩衝溶液 (pH 7.5) で  $1 \times 10^6/\text{ml}$  になるように懸濁し、胞子液を調製した。

得られた胞子溶液1.0mlに、100mM Tris/maleate緩衝溶液 (pH 7.5) 0.5 mlを加え、NTG 溶液 (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン 5 mg / 脱イオン水1 ml) 500  $\mu\text{l}$ を加えて、28℃で15分間インキュベートして変異処理を施した。10%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ を3 ml加えて、反応液を5500 x gで10分間遠心し、沈殿物(変異処理が施された胞子)を滅菌水3 mlで洗浄し、5500 x gで10分間遠心後、沈殿物に滅菌水を加えてNTG 処理された胞子懸濁液とした。

NTG 処理された胞子懸濁液は、 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ 程度に希釈し、GY寒天プレート(1%グルコース、0.5%酵母エキス、0.005%トリトン (Triton) X-100、1.5%寒天、pH 6.0)に塗布した。28℃で培養し、コロニーが出現したものの形態観察を行った結果、親株と生育形態の明らかに異なる菌株が得られた。親株を始めとする高度不飽和脂肪酸生産菌は、脂質を菌体内に蓄積するのでコロニー全体が菌糸で覆われるのに対して、今回得られた変異株はコロニーが油滴小胞 (Lipid ball) で覆われていた。

次いで、透明な液体培地(4%グルコース、1%酵母エキス pH 6.0) 4mlを試験管に入れ、120℃で20分間殺菌した後、上記で得られた菌株を一白金耳植菌し、28℃で2日間振盪培養したところ、培地は白濁した。この培地を10分以上静置しても培地上面には脂質の層

が見られなかった。従って脂質は油滴小胞として分泌されていると考えられる。

GY寒天プレート上の培養で得られたコロニーを覆っていた油滴小胞を薄層クロマトグラフィー (TLC) により脂質分析を行った。予め活性化したプレート (Merck 5554、200 x 200 x 0.25mm, silica gel 60F-254, aluminium sheet) にサンプルとコントロール (リン脂質、トリグリセリド、脂肪酸) を塗布し、*n*-ヘキサン : ジエチルエーテル : 酢酸 = 80 : 20 : 2 (V/V/V) 溶液で展開し、リンモリブデン酸 (10% リンモリブデン酸エタノール溶液) とプリムリン (0.01% プリムリン 80% アセトン溶液) を発色剤に使用した。なお、プリムリンについては、長波長 (366 nm) の紫外線下でバンド観察した。その結果、菌体外に認められた油滴小胞中の脂質の大部分がトリグリセリドであることが明らかとなった。

こうして、高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とするトリグリセリドを主に内包する油滴小胞を菌体外に分泌する変異株モルティエセラ・アルピナ SAM2241 FERM BP-7272 及び SAM2242 が約 3000 個のコロニーから得られた。

#### 実施例 2 . 油滴小胞を菌体外に分泌する菌 *Mortierella alpina* SAM 2241 を種々の培地で培養した場合の、菌体外に分泌された脂質の脂肪酸分析

培地 A, B, C, D, E, F それぞれ 4 ml を試験管に入れ、120 °C で 20 分間殺菌した。実施例 1 で得たモルティエセラ・アルピナ SAM2241 (FERM BP-7272) を培地に一白金耳植菌し、28°C で 2 日間、その後 12 °C で 7 日間振盪培養した。培養後、濾過により菌体と濾液に分別した。得られた濾液をネジ口試験管 (16.5mmφ) に入れ、凍結乾燥した後、塩化メチレン 1 ml、無水メタノール-塩酸 (10%) 2 ml を加



え、50℃で3時間処理することによってメチルエステル化し、*n*-ヘキサン4 ml、水1 mlを加えて、2回抽出し、抽出液の溶媒を遠心エバポレーター（40℃、1時間）で留去した後、得られた脂肪酸メチルエステルをキャピラリーガスクロマトグラフィーで分析した。なお、メチルエステル化時に内部標準として0.2 mg/mlの*n*-ヘプタデカン酸（17:0）を1.0 ml加え、GLCの面積比より脂肪酸の定量を行った。

培地A	グルコース	1.0%
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.02
	ポリペプトン	1.5
	NaCl	0.2
	酵母エキス	0.1
	PH 7.0	,
培地B	ポリペプトン	1.0%
	肉エキス	0.5
	酵母エキス	0.1
	NaCl	0.5
	PH 7.0	
培地C	グルコース	5.0%
	ポリペプトン	0.5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.02
	酵母エキス	0.1
	PH 6.5	

培地 D	グルコース	2.0%
	酵母エキス	1.0
	バクトペプトン	1.0
培地 E (MRS 培地)	グルコース	2.0%
	肉エキス	1.0
	酵母エキス	0.5
	カゼイントリプシン消化物	1.0
	$K_2HPO_4$	0.2
	酢酸ナトリウム	0.5
	クエン酸二アンモニウム	0.2
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02
	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02
	Tween 80	0.1
培地 F	グルコース	1.0%
	酵母エキス	0.5
	PH 6.5	

結果を表 1 に示す。

表 1 各種培地で得られた菌体外に分泌された  
脂質中の脂肪酸組成 (%)

	16:0	18:0	18:1 (n-9)	18:2 (n-6)	18:3 (n-6)	DGLA	AA	その他
培地 A	14	8	20	11	4	4	31	8
培地 B	15	6	28	16	9	-	26	-
培地 C	17	14	13	10	3	2	37	4
培地 D	14	9	23	9	5	2	31	7
培地 E	16	3	30	11	7	2	27	4
培地 F	15	5	23	10	5	3	32	7

16:0、パルミチン酸； 18:0、ステアリン酸； 18:1 (n-9)、オ  
レイン酸； 18:2 (n-6)、リノール酸； 18:3 (n-6)、 $\gamma$ -リノレ  
ン酸； DGLA、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸； AA、アラキドン酸

いずれの培地においても、不飽和脂肪酸を含有する脂質を菌体外  
に分泌することが認められた。さらに、培地 A ~ F で得られた菌体  
外に分泌された脂質の全脂質量並びにアラキドン酸量はグルコース  
濃度と正の相関が認められた。即ち、試験管当たりの全脂質量は、  
グルコース濃度が1%の場合は0.18, 0.6 mg、グルコース濃度が2%の  
場合は0.53, 0.96 mg、グルコース濃度が5%の場合は2.11 mg とな  
り、試験管当たりのアラキドン酸量は、グルコース濃度が1%の場合  
は0.05, 0.15 mg、グルコース濃度が2%の場合は0.11, 0.19 mg、  
グルコース濃度が5%の場合は0.62 mg となった。

また、変異株 SAM2242 についても同様の傾向の結果が得られた。

### 実施例 3. 油滴小胞を菌体外に分泌する菌 *Mortierella alpina* SAM

2241の10L ジャーファーマンターによる通気攪拌培養に  
おけるアラキドン酸の生産量

グルコース 2%、大豆タンパク 1.5%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.1%、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05%、大豆油 0.2% を含む培地（A：pH 5.0、B：pH 6.0、C：pH 7.0）5Lを10L ジャーファーマンターに入れ、120℃で30分間殺菌した。実施例1で得たモルティエラ・アルピナ（Mortierella alpina）SAM2241（FERM B P-7272）を植菌し、通気量1.0 vvm、培養温度24℃で10日間の通気攪拌培養を行った。なお、培養1日目に2.0%グルコース、培養2日目に1.5%グルコース、培養3、4日目に1.0%グルコース、培養5、6日目に0.5%グルコースを添加した。

サンプリングは毎日実施し、培養液を遠心及び／又は濾過により菌体と濾液（菌体外に分泌された油滴小胞が分散）に分け、菌体は105℃で2時間乾燥させ、得られた乾燥菌体20mgをネジ口試験管（16.5 mm φ）に入れ、実施例2と同様にメチルエステル化を行った。また、濾液1mlをネジ口試験管（16.5 mm φ）に入れ、凍結乾燥後、実施例2と同様にメチルエステル化を行った。得られた脂肪酸メチルエステルをキャピラリーガスクロマトグラフィーで分析した。表2に培養9日目のアラキドン酸の生産量および含有率を示す。

表 2 培養 9 日目のアラキドン酸生産量及び含有率

		菌体内	菌体外	菌体外アラ キドン酸 の割合 (%)
培地 A	pH 5.0	6.4g/L (33.2%)	0.14g/L (37.4%)	2.1
培地 B	pH 6.0	5.8g/L (32.4%)	0.24g/L (34.5%)	4.0
培地 C	pH 7.0	3.6g/L (29.7%)	0.43g/L (30.8%)	10.7

なお、カッコ内の数字は全脂肪酸に占めるアラキドン酸の割合を表す。

培地の pH の上昇に伴ってアラキドン酸含有脂質の菌体外への分泌が促進された。

#### 実施例 4 . 油滴小胞を菌体外に分泌する菌 *Mortierella alpina* SAM 2241 が分泌した油滴小胞の脂質分析

実施例 3 で得られた培地 A, B, C で培養した培養 9 日目の培養濾液を、クロロホルム／メタノール／水 (1 : 2 : 0.8) 系による Blight-Dyer 法により処理し、菌体外に分泌された油滴小胞から全脂質を抽出した。得られた全脂質は、中性脂質 (トリグリセリド) と極性脂質 (リン脂質) を含んでおり、抽出した全脂質を Sep-pak Silica カートリッジ (Waters 社製) にチャージし、クロロホルム溶出により中性脂質画分、メタノール溶出により極性脂質画分を溶出し、溶剤を留去した後、実施例 2 と同様にメチルエステル化を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをキャピラリーガスクロマトグラフィーで分析した。トリグリセリドとリン脂質の結合する全脂肪酸の割合として、トリグリセリドとリン脂質の割合を算出した。結果、培地 A, B, C のトリグリセリドの全脂質に占める割合は、それぞれ 95.3%, 97.7%, 96.2% であった。

実施例 5 . 油滴小胞を菌体外に分泌する菌 *Mortierella alpina* SAM 2241 の 10 L バイオリアクターによる連続培養

セラミックフィルター 2 本を内臓した 10 L バイオリアクターに、グルコース 2 %、酵母エキス 2 % 含有し pH を 7 に調整した培地 5 L を調製し、実施例 1 で得たモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) SAM2241 (FERM BP-7272) を前培養した菌株を植菌して通気攪拌を行った。翌日さらに培地内グルコース濃度が 3 % 増加するようにセラミックフィルターを通じてグルコース溶液を添加した。2 日目にも同様に培地内グルコース濃度が 3 % 増加するようにセラミックフィルターを通じてグルコース溶液を添加した。

3 日目以降、5 % グルコース、0.05 % 酵母エキス溶液を約 1000 ml / 日の速度でセラミックフィルターを通じて連続的に流加した。そして約 600 ml / 日 (液量の変動しないよう調整する) でセラミックフィルターから培養液を連続的に抜き出した。フィルターが菌体で目づまりするのを防ぐため、グルコース、酵母エキス溶液の供給と培地の抜き出しを適宜交互に入れ替えた。通気による水分の蒸発があるためジャー内液量はほぼ一定に保たれた。また、グルコースの流加濃度は抜き出すグルコース濃度により調節した。

この結果培養 10 日間にわたって、アラキドン酸を含有したトリグリセリドを約 1 g / L 含有した培地 (培養液) を連続的に取り出すことができた。

実施例 6 . 培地に添加した油脂の微生物変換と、油滴小胞を菌体外に分泌する菌 *Mortierella alpina* SAM2241 による油滴小胞への移行

グルコース 1% および酵母エキス 1% を含む培地 (pH 6.0) 2 ml に亜

麻仁油または魚油を2%添加し、10 ml のエルレンマイヤーフラスコに入れ、120 ℃で20分間殺菌した。実施例1 で得たモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) SAM2241 (FERM BP-7272) を培地に一白金耳接種し、レシプロシェーカー (150 rpm) により、28℃で8 日間培養した。濾過により濾液を回収し、凍結乾燥後、菌体外に分泌した脂質を、実施例2 と同様にメチルエステル化を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをキャピラリーガスクロマトグラフィーで分析した。

亜麻仁油を培地に添加した場合は、亜麻仁油の主要脂肪酸である9, 12, 15-オクタデカトリエン酸 ( $\alpha$ -リノレン酸) が、変異株の脂肪酸合成系酵素の基質となり、6, 9, 12, 15- オクタデカテトラエン酸 (ステアリドン酸)、8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸、5, 8, 11, 14, 17- エイコサペンタエン酸に変換され、油滴小胞中の脂質に、6, 9, 12, 15- オクタデカテトラエン酸 (ステアリドン酸)、8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸、5, 8, 11, 14, 17- エイコサペンタエン酸がそれぞれ2.4, 3.3, 8.1%含まれており、変換された脂肪酸がトリグリセリドの構成脂肪酸として菌体外に分泌することが確認できた。また、魚油を培地に添加した場合には、魚油の5, 8, 11, 14, 17- エイコサペンタエン酸や4, 7, 10, 13, 16, 19- ドコサヘキサエン酸が菌に取り込まれ、トリグリセリドの構成脂肪酸として菌体外に分泌することが、菌体外に分泌された油滴小胞中の脂質に5, 8, 11, 14, 17- エイコサペンタエン酸や4, 7, 10, 13, 16, 19- ドコサヘキサエン酸が8.1, 12.2%含まれていたことから確認できた。

#### 実施例7. *Mortierella alpina* SAM2241が菌体外に分泌する油滴小胞の成分分析

菌体外に分泌した油滴小胞の成分分析を行うために、実施例1で得たモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) SAM2241 の胞子液をGY寒天プレート (1%グルコース、0.5%酵母エキス、0.005%トリトン (Triton) X-100、1.5%寒天、pH6.0) に塗布し、28℃で4日間培養した。実施例1で示したのと同じように、コロニー全体が油滴小胞 (Lipid ball) で覆われていた。そこで、その小胞をネジ口試験管 (16.5mmφ) に集めた。そして、クロロホルム2ml と KCl 溶液 2mlを加えて攪拌、抽出した。クロロホルム層には脂質が、KCl 溶液層には糖質及びタンパク質が移行し、常法にしたがって成分分析を行った結果、糖質：38.1%、タンパク質：18.2%、脂質：43.7%であった。

#### 実施例 8 . 油滴小胞を使用した調製乳の調製

実施例 3 で得られた培養濾液を、遠心分離機 (TOMY RL-101) で 1500 x g の遠心により分離し、滅菌水で洗浄して、食用に適した油滴小胞を調製した。この油滴小胞を、粉乳 100 g に 0.92 g 添加することにより、油滴小胞を含む調製乳を調製した。得られた調製乳中のアラキドン酸の組成は、全脂肪酸の 0.5% であり、これは母乳の組成に類似していた。

また、得られた調製乳を水に溶解した場合、水への分散性は極めて良好で、均一に分散し、油分が分離することはなかった。

#### 実施例 9 . カプセル剤の調製

ゼラチン 100 重量部及び食添グリセリン 35 重量部に水を加え 50-60℃ で溶解し、粘度 20000cps のゼラチン皮膜を調製した。次に実施例 3 で得た培養濾液から遠心により分離した油滴小胞から常法に従って脂質を抽出・精製した。そして、精製油 97%、ビタミン E 油 3%



を混合し、内容物を調製した。これらを用いて、常法によりカプセル成型及び乾燥を行い、1粒あたり180mgの内容物を含有するソフトカプセルを製造した。

#### 実施例 10. 油滴小胞を含む飲料の調製

オレンジジュース 10L に、実施例 8 に示す方法で得た、食用に適した油滴小胞 10g を添加することにより、油滴小胞を含むジュースを調製した。

特許協力条約第13規則の2の寄託された微生物への言及及び寄託  
機関

寄託機関 名 称：工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1-3

微生物(1) 表 示：Mortierella elongata SAM 0219

寄託番号：FERM BP-1239

寄託日：1986年3月19日

(2) 表 示：Mortierella alpina SAM 2241

寄託番号：FERM BP-7272

寄託日：2000年8月11日

## 請 求 の 範 囲

1. 不飽和脂肪酸を有する脂質を、該脂質を内包する油滴小胞として菌体外に分泌することを特徴とする微生物。
2. 上記不飽和脂肪酸が、炭素数が18以上で二重結合数が2以上の脂肪酸である請求項1記載の微生物。
3. 上記微生物が、糸状菌である請求項1又は2記載の微生物。
4. 上記微生物が、モルティエラ属に属する微生物である請求項3記載の微生物。
5. 上記微生物が、モルティエラ属モルティエラ亜属に属する微生物である請求項4記載の微生物。
6. 上記微生物が、アルピナ種に属する微生物である請求項5記載の微生物。
7. 上記微生物が、固体培地上で生育させた場合にコロニーの周りに脂質を含む油滴小胞を形成する特性及び／又は透明液体培地を用いて培養した場合に培養液が白濁する特性を有する請求項1～6のいずれか1項に記載の微生物。
8. 上記微生物が、菌体内に不飽和脂肪酸を有する脂質を蓄積する能力を有する微生物に人為的処理を施して得られる請求項1～7のいずれか1項に記載の微生物。
9. 上記微生物が、菌体内に不飽和脂肪酸を有する脂質を蓄積する能力を有する微生物に人為的処理を施し、得られた株から、固体培地で培養して、コロニーの周りが脂質を含む油滴小胞で覆われる株を選抜し、続いて選抜した株をさらに透明液体培地を用いて培養した場合に培養液が白濁する株を選抜することによって選択される請求項1～7のいずれか1項に記載の微生物。
10. 上記微生物が、スフェロプラスト化又はプロトプラスト化

可能な請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の微生物。

1 1 . 不飽和脂肪酸を有する脂質を菌体外に分泌する特徴を有する糸状菌。

1 2 . 上記菌体外に分泌された脂質が、トリグリセリドを 5 0 % 以上含有する脂質である請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の微生物。

1 3 . 上記不飽和脂肪酸が、アラキドン酸である請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の微生物。

1 4 . 上記脂質が、アラキドン酸を脂質中の全脂肪酸に対して 1 0 % 以上含有する請求項 1 3 記載の微生物。

1 5 . 不飽和脂肪酸を有する脂質を内包する油滴小胞。

1 6 . 上記不飽和脂肪酸が、炭素数が 1 8 以上で二重結合数が 2 以上の不飽和脂肪酸である請求項 1 5 記載の油滴小胞。

1 7 . 上記油滴小胞が、微生物によって産生される請求項 1 5 又は 1 6 に記載の油滴小胞。

1 8 . 上記請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の微生物を液体培地中で培養し、培養液から得られる、脂質を内包する油滴小胞。

1 9 . 上記油滴小胞が、水又は親水性物質に均一に分散することが可能な請求項 1 5 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の油滴小胞。

2 0 . 上記油滴小胞が、小胞に内包される脂質を酸化に対して安定に保持するものである請求項 1 5 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の油滴小胞。

2 1 . 上記油滴小胞が、遠心分離によって分離可能な請求項 1 5 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の油滴小胞。

2 2 . 上記油滴小胞の膜が、糖質及びタンパク質、脂質からなる請求項 1 5 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載の油滴小胞。

2 3 . 上記油滴小胞の直径が、平均 0 . 2 ～ 1 0  $\mu$  m である請求

項 1 5 ～ 2 2 のいずれか 1 項に記載の油滴小胞。

2 4 . 上記油滴小胞に内包される脂質が、トリグリセリドを 5 0 % 以上含有する脂質である請求項 1 5 ～ 2 3 のいずれか 1 項に記載の油滴小胞。

2 5 . 上記請求項 1 5 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載の油滴小胞から分離された脂質。

2 6 . 上記請求項 1 5 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載の油滴小胞を添加してなる食品、化粧品又は動物飼料。

2 7 . 油滴小胞を添加してなる食品が、機能性食品、栄養補助食品、未熟児用調製乳、乳児用調製乳、乳児用食品、妊産婦食品又は老人用食品である請求項 2 6 記載の食品。

2 8 . 油滴小胞を添加してなる食品が、飲料である請求項 2 6 記載の食品。

2 9 . 上記請求項 2 5 記載の脂質を添加してなる食品、化粧品、医薬品又は動物飼料。

3 0 . 上記請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の微生物を、液体培地中で培養し、培養液から脂質を内包する油滴小胞を採取することを特徴とする、油滴小胞の製造方法。

3 1 . 上記請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の微生物を、液体培地中で連続的に培養し、培養液から連続的に脂質を内包する油滴小胞を採取することを特徴とする、油滴小胞の製造方法。

3 2 . 上記請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の微生物を、液体培地中で培養し、培養液から脂質を内包する油滴小胞を採取し、該油滴小胞から脂肪酸を有する脂質を分離することを特徴とする、脂質の製造方法。

3 3 . 上記請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の微生物を、液体培地中で培養し、培養液から脂質を内包する油滴小胞を採取し、

該油滴小胞から脂肪酸を有する脂質を分離し、該脂質から不飽和脂肪酸を単離することを特徴とする、不飽和脂肪酸の製造方法。

34. 炭素数が18で二重結合数が3以上又は炭素数が20以上で二重結合数が2以上である不飽和脂肪酸を有する脂質を菌体外に分泌する特徴を有する微生物。

35. 炭素数が18で二重結合数が3以上又は炭素数が20以上で二重結合数が2以上である不飽和脂肪酸を有する脂質を直接、菌体外に分泌することを特徴とする微生物。

36. 上記微生物が、糸状菌である請求項34又は35記載の微生物。

37. 上記微生物が、固体培地上で生育させた場合にコロニーの周りに脂質を含む油滴小胞を形成する特性及び／又は透明液体培地を用いて培養した場合に培養液が白濁する特性を有する請求項34～36のいずれか1項に記載の微生物。

38. 上記微生物が、菌体内に炭素数が18で二重結合数が3以上又は炭素数が20以上で二重結合数が2以上である脂肪酸を有する脂質を蓄積する能力を有する微生物に人為的処理を施して得られる請求項34～37のいずれか1項に記載の微生物。

39. 上記微生物が、菌体内に炭素数が18で二重結合数が3以上又は炭素数が20以上で二重結合数が2以上である脂肪酸を有する脂質を蓄積する能力を有する微生物に人為的処理を施し、得られた株から、透明液体培地を用いて培養して培養液が白濁し、その後、脂質層が分離する株を選抜することによって選択される請求項35又は36記載の微生物。

40. 上記微生物が、スフェロプラスト化又はプロトプラスト化可能な請求項34～39のいずれか1項に記載の微生物。

41. 上記菌体外に分泌された脂質が、トリグリセリドを50%

以上含有する脂質である請求項 34～40 のいずれか 1 項に記載の微生物。

42. 上記請求項 34～41 のいずれか 1 項に記載の微生物を、液体培地中で培養し、培養液から脂質を採取することを特徴とする、不飽和脂肪酸を有する脂質の製造方法。

43. 上記請求項 34～41 のいずれか 1 項に記載の微生物を、液体培地中で連続的に培養し、培養液から連続的に脂質を採取することを特徴とする、不飽和脂肪酸を有する脂質の製造方法。

44. 透明液体培地を用い培養液が白濁することを指標に、不飽和脂肪酸を有する脂質を菌体外に分泌する能力を有する微生物を選択することを特徴とするスクリーニング方法。

45. 上記不飽和脂肪酸が炭素数が 18 で二重結合数が 3 以上又は炭素数が 20 以上で二重結合数が 2 以上の脂肪酸である請求項 44 に記載のスクリーニング方法。

46. 上記微生物が糸状菌である請求項 44 に記載のスクリーニング方法。

47. 菌体内に不飽和脂肪酸を有する脂質を蓄積する能力を有する微生物に人為的処理を施して得られる株から、固体培地で培養してコロニーの周りが脂質を含む油滴小胞で覆われる株を選抜することによって、該脂質を菌体外に分泌する特徴を有する株を選択することを特徴とするスクリーニング方法。

48. 菌体内に不飽和脂肪酸を有する脂質を蓄積する能力を有する微生物に人為的処理を施して得られる株から、固体培地で培養してコロニーの周りが脂質を含む油滴小胞で覆われる株を選抜し、続いて選抜した株をさらに透明液体培地を用いて培養した場合に培養液が白濁する株を選抜することによって、該脂質を菌体外に分泌する特徴を有する株を選択することを特徴とするスクリーニング方法

。

49. 上記人為的処理が、N-メチル-N'-ニトロ-N- ニトロソグアニジン (NTG) による変異処理である請求項 47 又は 48 に記載のスクリーニング方法。

50. 上記人為的処理が、変異処理、遺伝子操作または細胞融合である請求項 47 又は 48 に記載のスクリーニング方法。

51. 請求項 44 ~ 50 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法によって選抜される微生物。



## INTERNATIO SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05425

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N1/14, C12P7/64, A23D7/00, A23K1/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N1/14, C12P7/64, A23D7/00, A23K1/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP, 648076, A (Danochemo A/S), 19 April, 1995 (19.04.95), Claims & WO, 94/01001 & JP, 07-508417, A (Danochemo A/S), 21 September, 1995 (21.09.95), Claims	15-17, 19-29
X	JP, 07-289143, A (Kao Corporation), 07 November, 1995 (07.11.95), Claims	15-17, 19-29
A	JP, 06-153970, A (SUNTORY LIMITED), 03 June, 1994 (03.06.94), Claims (Family: none)	1-51
A	JP, 05-91889, A (SHOWA SANGYO CO., LTD.), 16 April, 1993 (16.04.93), Claims (Family: none)	1-51

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
05 September, 2000 (05.09.00)Date of mailing of the international search report  
19 September, 2000 (19.09.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N1/14, C12P7/64, A23D7/00, A23K1/16

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N1/14, C12P7/64, A23D7/00, A23K1/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP, 648076, A (Danochemo A/S), 19. 4月. 1995 (19. 04. 95), 特許請求の範囲&WO, 94/01001, A1&JP, 07-508417, A (ダノチェモ アクチェセルスカベト), 21. 9月. 1995 (21. 09. 95), 特許請求の範囲	15-17, 19-29
X	JP, 07-289143, A (花王株式会社), 7. 11月. 1995 (07. 11. 95), 特許請求の範囲	15-17, 19-29

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 09. 00

国際調査報告の発送日

19.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹

4B

9349

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 06-153970, A (サントリー株式会社) 3. 6月. 1994 (03. 06. 94), 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-51
A	J P, 05-91889, A (昭和産業株式会社), 16. 4月. 1993 (16. 04. 93), 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-51

# PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP00/05425

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

## NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

ISHIDA, Takashi  
A. Aoki, Ishida & Associates  
Toranomon 37 Mori Bldg.  
5-1, Toranomon 3-chome  
Minato-ku, Tokyo 105-8423  
JAPON

73

Date of mailing (day/month/year) 22 February 2001 (22.02.01)		
Applicant's or agent's file reference H797-PCT		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/05425	International filing date (day/month/year) 11 August 2000 (11.08.00)	Priority date (day/month/year) 13 August 1999 (13.08.99)
Applicant SUNTORY LIMITED et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
**AU, KR, US**

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
**CA, EP, JP**

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 22 February 2001 (22.02.01) under No. WO 01/12780

### REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

### REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年08月11日 (11. 08. 2000) 金曜日 16時47分56秒

H797-PCT

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.91 (updated 01. 07. 2000)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	H797-PCT
I	発明の名称	脂質を菌体外に分泌する微生物ならびに当該微生物を用いた脂質および脂質を内包する油滴小胞の製造方法
II	出願人	出願人である (applicant only)
II-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-2	右の指定国についての出願人である。	サントリー株式会社 SUNTORY LIMITED 530-8203 日本国 大阪府 大阪市北区堂島浜 2丁目1番40号 1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203 Japan
II-4)a	名称	
II-4en	Name	
II-5)a	あて名:	
II-5en	Address:	
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-1	この欄に記載した者は	米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	秋元 健吾 AKIMOTO, Kengo 618-0001 日本国 大阪府 三島郡島本町 山崎1-9-5-1006 1-9-5-1006, Yamazaki, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618-0001 Japan
III-1-4)a	氏名(姓名)	
III-1-4en	Name (LAST, First)	
III-1-5)a	あて名:	
III-1-5en	Address:	
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年08月11日 (11. 08. 2000) 金曜日 16時47分56秒

H797-PCT



III-2	その他の出願人又は発明者	
III-2-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-2-4ja	氏名(姓名)	河島 洋
III-2-4en	Name (LAST, First)	KAWASHIMA, Hiroshi
III-2-5ja	あて名:	569-1121 日本国
III-2-5en	Address:	大阪府 高槻市真上町 6-11-1-113 6-11-1-113, Magami-cho, Takatsuki-shi, Osaka 569-1121 Japan
III-2-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-2-7	住所(国名)	日本国 JP
III-3	その他の出願人又は発明者	
III-3-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-3-4ja	氏名(姓名)	清水 昌
III-3-4en	Name (LAST, First)	SHIMIZU, Sakayu
III-3-5ja	あて名:	616-8212 日本国
III-3-5en	Address:	京都府 京都市右京区 常盤山下町6-9 6-9, Tokiwayamashita-cho, Ukyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 616-8212 Japan
III-3-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-3-7	住所(国名)	日本国 JP
IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名(姓名)	石田 敬
IV-1-1en	Name (LAST, First)	ISHIDA, Takashi
IV-1-2ja	あて名:	105-8423 日本国
IV-1-2en	Address:	東京都 港区虎ノ門 三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 A. AOKI, ISHIDA & ASSOCIATES Toranomom 37 Mori Bldg., 5-1, Toranomom 3-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8423 Japan
IV-1-3	電話番号	03-5470-1900
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-5470-1911
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja	氏名	鶴田 準一; 福本 積; 西山 雅也
IV-2-1en	Name(s)	TSURUTA, Junichi; FUKUMOTO, Tsumoru; NISHIYAMA, Masaya

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年08月11日 (11. 08. 2000) 金曜日 16時47分56秒

H797-PCT

V	国の指定		
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国	
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AU CA JP KR US	
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。		
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)	
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張		
VI-1-1	先の出願日	1999年08月13日 (13. 08. 1999)	
VI-1-2	先の出願番号	特願平11-229509号	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	4	-
VIII-2	明細書	30	-
VIII-3	請求の範囲	6	-
VIII-4	要約	1	styh797.txt
VIII-5	図面	0	-
VIII-7	合計	41	
VIII-8	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-8	手数料計算用紙	✓	-
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号		
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名(姓名)	石田 敬	
IX-2	提出者の記名押印		
IX-2-1	氏名(姓名)	鶴田 準一	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年08月11日 (11.08.2000) 金曜日 16時47分56秒

H197-PCT

IX-3	提出者の記名押印		
IX-3-1	氏名(姓名)	福本 積	
IX-4	提出者の記名押印		
IX-4-1	氏名(姓名)	西山 雅也	

## 受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面 :	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であつてその後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

## 国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

0-1	様式-PCT/RO/134 (EASY) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.91 (updated 01. 07. 2000)
0-1-1		
0-2	国際出願番号.	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	H797-PCT
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	記載頁	30
1-2	行	5-7
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	通商産業省・工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1-3
1-3-3	寄託の日付	1986年03月19日 (19. 03. 1986)
1-3-4	受託番号	NIBH FERM BP-1239
1-4	追加の表示	なし (NONE)
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
1-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし (NONE)
2	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
2-1	記載頁	30
2-2	行	8-10
2-3	寄託の表示	
2-3-1	寄託機関の名称	通商産業省・工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH)
2-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1-3
2-3-3	寄託の日付	2000年08月11日 (11. 08. 2000)
2-3-4	受託番号	NIBH FERM BP-7272
2-4	追加の表示	なし (NONE)
2-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
2-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし (NONE)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## 受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに 受理した (はい/いいえ)	
0-4-1	権限のある職員	

## 国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理 された日	
0-5-1	権限のある職員	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**